

#4

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE.

In re the application of:

Hans HORNAUER et al

Serial Number: Unknown

Filed: November 2, 1998

For: POLYETHYLENE GLYCOL-DERIVATIZED BIOMOLECULES AND THEIR USE  
IN HETEROGENEOUS DETECTION METHODS

CLAIM TO PRIORITY UNDER 35 USC 119

Assistant Commissioner for Patents  
Washington, D.C. 20231

November 2, 1998

Sir:

The benefit of the filing date of the following prior foreign application is hereby requested for the above-identified application, and the priority provided in 35 USC 119 is hereby claimed:

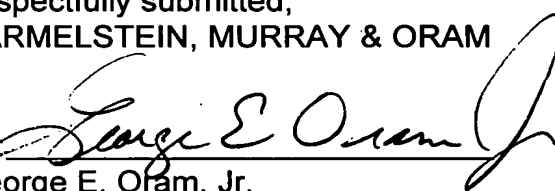
German Patent Application No. 197 48 489.1 filed November 3, 1997.

In support of this claim, the requisite certified copy of said original foreign application is filed herewith.

It is requested that the file of this application be marked to indicate that the applicants have complied with the requirements of 35 USC 119 and that the Patent and Trademark Office kindly acknowledge receipt of this document.

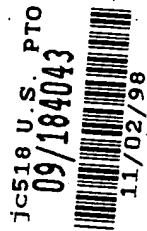
In the event any fees are required, please charge our Deposit Account No. 14-1060.

Respectfully submitted,  
NIKAIDO, MARMELSTEIN, MURRAY & ORAM

By   
George E. Oram, Jr.  
Attorney for Applicants  
Registration No. 27,931

Atty. Docket No.: P564-8023  
Metropolitan Square  
Suite 330 - G Street Lobby  
655 15th Street, N.W.  
Washington, D.C. 20005-5701  
Telephone: (202) 638-5000  
GEO/cb





## Bescheinigung

Die Boehringer Mannheim GmbH in Mannheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Polyethylenglykol-derivatisierte Biomoleküle und deren Verwendung in heterogenen Nachweisverfahren"

am 3. November 1997 beim Deutschen Patentamt eingereicht.

Das angeheftete Stück ist eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlage dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patentamt vorläufig das Symbol G 01 N 33/543 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 13. Oktober 1998

Der Präsident des Deutschen Patentamts

Im Auftrag

Aktenzeichen: 197 48 489.1

Ebert

**PATENTANWÄLTE**

DIPL.-ING. H. WEICKMANN  
DIPL.-ING. F. A. WEICKMANN  
DIPL.-CHEM. B. HUBER  
DR.-ING. H. LISK  
DIPL.-PHYS. DR. J. PRECHTEL  
DIPL.-CHEM. DR. B. BÖHM  
DIPL.-CHEM. DR. W. WEISS  
DIPL.-PHYS. DR. J. TIESMEYER  
DIPL.-PHYS. DR. M. HERZOG

POSTFACH 860 820  
81635 MÜNCHEN  
KOPERNIKUSSTRASSE 9  
81679 MÜNCHEN  
TELEFON (089) 4 55 63-0  
TELEX 5 22 621  
TELEFAX (089) 4 70 50 68  
eMail weickmann@compuserve.com

1-3. Nov. 1997

Unser Zeichen:  
16812P DE/WWvo

*eingereicht*

Anmelder:  
Boehringer Mannheim GmbH  
Sandhofer Strasse 112-132

68305 Mannheim-Waldhof

---

Polyethylenglykol-derivatisierte Biomoleküle und deren Verwendung in  
heterogenen Nachweisverfahren

---

## **Polyethylenglykol-derivatisierte Biomoleküle und deren Verwendung in heterogenen Nachweisverfahren**

5

### **Beschreibung**

Die Erfindung betrifft Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe und für solche Verfahren geeignete Reagenzienkits.

- 10 Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, bei denen eine Festphase verwendet wird, werden als heterogene Testformate bezeichnet. Ein Problem bei derartigen Verfahren besteht darin, daß oftmals eine unspezifische Bindung von Bestandteilen der Probe oder von Testreagenzien an die Festphase auftritt, wodurch falsche Testergebnisse erhalten werden
- 15 können. Besonders häufig werden diese unspezifischen Bindungen bei Proben aus Körperflüssigkeiten, z.B. Serum oder Plasma beobachtet. Um diese unspezifischen Bindungen zu unterdrücken, besteht die Möglichkeit, den Reagenzien oberflächenaktive Substanzen wie z.B. Tween 20 zuzusetzen (WO88/07683). Bekannt ist außerdem die Funktionalisierung von
- 20 metallischen Oberflächen (Whitesides et al., Science 252 (1991), 1164-1166) und von oxidischen Oberflächen (EP-A-0 664 452) mit reaktiven Polyethylenglykol-Derivaten, um die unspezifische Bindung auf der Oberfläche zu minimieren.
- 25 Dem Stand der Technik zur Verringerung der unspezifischen Bindung von oberflächenaktiven Substanzen haben den Nachteil, daß sie an der Festphasegebundene Moleküle, z.B. Festphasenrezeptoren, verdrängen und auf diese Weise die Testfunktion beeinträchtigen. Darüber hinaus werden als oberflächenaktive Substanzen in der Regel großtechnisch hergestellte
- 30 Waschmitteltenside verwendet, die in ihrer Zusammensetzung heterogen sind und gelegentlich Verunreinigungen enthalten. Die daraus resultierenden Chargenschwankungen führen oft zu Störungen und nicht reproduzierbaren

Ergebnissen. Darüber hinaus können empfindliche Festphasenmoleküle, z.B. Proteine, durch die oberflächenaktiven Substanzen in ihrer Struktur gestört und letztlich denaturiert werden.

- 5 Die aus dem Stand der Technik bekannte Funktionalisierung von metallischen oder oxidischen Oberflächen mit Polyethylenglykol ist einerseits auf bestimmte Arten von Oberflächen beschränkt und andererseits nicht ausreichend, um die unspezifische Bindung an eine auf der Festphasenoberfläche aufgebraute Schicht von Biomolekülen zu verhindern.

10

Die der vorliegenden Erfindung zugrundeliegende Aufgabe bestand somit darin, ein neues Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine Festphase beim Nachweis eines Analyten in einer Probe bereitzustellen, bei der die Nachteile des Standes der Technik mindestens teilweise

15 vermieden werden können.

15

Ein erster Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Festphase, umfassend in immobilisierter Form
- 20 einen analytspezifischen Festphasenreaktanden und ein analytunspezifisches Biomolekül, das mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelt ist,
- (b) Inkubieren der Probe mit der Festphase und einem Testreagenz und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten
- 25 in der Probe.

25

Durch Blockierung der Festphase mit einem Polyalkylenoxid-, insbesondere mit einem Polyethylenglykol-modifizierten analytunspezifischen Biomolekül konnte eine deutliche Verringerung der unspezifischen Bindung von

30 Probenbestandteilen an die Festphase erreicht werden, ohne daß gleichzeitig die Testsensitivität signifikant beeinträchtigt wurde. Die Zugabe des Blockierungsreagenz kann während oder/und nach der Immobilisierung des

30

Festphasenreaktanden erfolgen. Besonders bevorzugt wird eine mit einem analytspezifischen Festphasenreaktanden vorbelegte Festphase nachträglich mit einem analytunspezifischen Biomolekül blockiert.

5 Gute Ergebnisse wurden bei Verwendung von Festphasen erhalten, die "begrenzte Testflächen" aufweisen, d.h. mit einem Festphasenreaktanden belegte begrenzte Bereiche, die durch inerte Bereiche von weiteren Testflächen räumlich getrennt sind. Besonders bevorzugt sind flächig mit einer analytunspezifischen Vorbeschichtung, z.B. mit Streptavidin,  
10 überzogene Festphasen, die mindestens eine räumlich begrenzte Testfläche, auf der ein analytspezifischer Festphasenreaktand immobilisiert ist, enthalten. Die begrenzten Testflächen haben bevorzugt einen Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  bis 10 mm. Besonders bevorzugt sind miniaturisierte Testflächen mit einem Durchmesser von 10  $\mu\text{m}$  bis 2 mm. Weiterhin bevorzugt sind Festphasen  
15 mit mehreren Testflächen, die unterschiedliche analytspezifische Festphasenreaktanden enthalten können und auch als Array-Systeme bezeichnet werden (vgl. z.B. US-Patente 5,432,099; 5,516,635 und 5,126,276). Mit diesen Array-Systemen können mehrere Analytbestimmungen gleichzeitig an einer Probe durchgeführt werden.

20 Die Festphase im erfindungsgemäßen Verfahren umfaßt einen beliebigen Träger, wobei nichtporöse Träger, z.B. Träger mit Kunststoff-, Glas-, Metall- oder Metalloxydoberfläche bevorzugt sind. Auch poröse Träger, wie etwa Teststreifen sind geeignet.

25 Auf der Festphase wird ein analytspezifischer Festphasenreaktand immobilisiert, d.h. ein Biomolekül, welches eine spezifische Wechselwirkung mit einem zu bestimmenden Analyten oder - im Falle kompetitiver Testformate - mit einem Analogon eines zu bestimmenden Analyten eingehen kann.  
30 Beispiele für analytspezifische Festphasenreaktanden sind Antikörper, Antigene, Peptide, Haptene, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge, Glykoproteine, Saccharide, Lipoproteine und andere Biomoleküle.

Die Immobilisierung des Festphasenreaktanden kann nach bekannten Methoden erfolgen, z.B. durch direkte adsorptive Bindung, durch kovalente Kopplung oder vorzugsweise durch Kopplung über hochaffine Bindepaare. Hierzu wird die Festphase zunächst mit einem ersten Partner eines  
5 hochaffinen Bindepaares belegt und daran ein Konjugat des Festphasenreaktanden mit dem zweiten Partner des Bindepaares immobilisiert. Beispiele für geeignete hochaffine Bindepaare sind Streptavidin oder Avidin/Biotin oder ein Biotinderivat (beispielsweise Desthiobiotin, Iminobiotin, Aminobiotin oder eine andere mit hoher Affinität an Streptavidin oder Avidin bindefähige  
10 Substanz), Antikörper/Hapten (beispielsweise Digoxigenin, Fluorescein etc.), Antikörper/Antigen (beispielsweise Peptid oder Polypeptid), Lectin/Zucker und Rezeptor/Ligand (beispielsweise ...). Besonders bevorzugt verwendet man als hochaffines Bindepaar Streptavidin oder Avidin/Biotin.

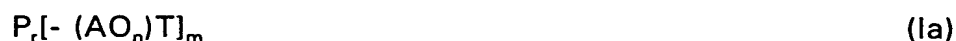
15 Das erfindungsgemäße Verfahren umfaßt vorzugsweise das Blockieren unspezifischer Bindestellen auf der bereits mit dem analytspezifischen Festphasenreaktanden belegten Festphase durch Inkubieren mit einem Alkylenoxid-modifizierten Bindemolekül, das als Blockierungssubstanz wirkt. Zeitdauer und Temperatur der Inkubation können innerhalb weiter Bereiche  
20 variiert werden, beispielhaft sind Inkubationstemperaturen von 4°C bis 40°C und Inkubationszeiten von 1 min bis 1 h.

Als Blockierungssubstanzen geeignet sind analytunspezifische bzw. inerte Biomoleküle, die an die Festphase bindefähig sind und nicht mit dem  
25 Nachweisverfahren interferieren, beispielsweise Proteine wie Albumine, unspezifische Antikörper oder Fragmente davon, oder Polysaccharide wie Dextrine etc. Die Bindung der Blockierungssubstanz an die Festphase kann über adsorptive oder kovalente Wechselwirkungen erfolgen. Bevorzugt ist jedoch eine Bindung über hochaffine Bindepaare. Insbesondere bei einer  
30 Festphase, die den Festphasenreaktanden immobilisiert über ein hochaffines Bindepaar enthält, verwendet man vorzugsweise eine Blockierungssubstanz, die den zweiten Partner des Bindepaares umfaßt, z.B. ein biotinyliertes

Protein, das einen oder mehrere Polyalkylenoxidreste enthält. Alternativ ist auch die Verwendung von Blockierungssubstanzen bevorzugt, bei denen ein oder mehrere Polyalkylenoxidreste direkt an den zweiten Partner des Bindepaares gekoppelt sind.

5

Bevorzugte Blockierungssubstanzen sind Konjugate der allgemeinen Strukturformeln (Ia) oder (Ib):



worin

P ein Partner eines hochaffinen Bindepaares ist,

I ein Biomolekül ist,

15 r eine Zahl von 1 bis 10 ist,

AO eine (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxidgruppe ist,

n eine Zahl von 5 bis 500 ist,

T eine Endgruppe ausgewählt aus OH, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy und ... ist und

m eine Zahl von 1 bis 10 ist.

20

P ist vorzugsweise ein Hapten, Biotin oder ein Biotinderivat. Besonders bevorzugt ist P Biotin oder ein Biotinderivat. I ist vorzugsweise ein Polypeptid oder Saccharid. Bei Konjugaten der Formel (Ia) ist r vorzugsweise 1.

25

AO kann eine (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxidgruppe sein, d.h. eine Ethylenoxid- oder /und eine Propylenoxidgruppe. Vorzugsweise ist AO eine Ethylenoxidgruppe, doch auch Kombinationen von Ethylenoxid- und Propylenoxidgruppen sind geeignet. n ist vorzugsweise eine Zahl von 10 bis 250 und besonders  
30 bevorzugt 20 bis 200.



T ist vorzugsweise OH oder Methoxy. Bei Konjugaten der Strukturformel (Ia) ist m vorzugsweise 1.

Die Konjugate gemäß Strukturformel (Ia) und (Ib) werden vorzugsweise als  
5 Blockierungsreagenzien in Nachweisverfahren eingesetzt. Nach Immobilisierung auf einer Festphase sind sie vorzugsweise nicht mehr in der Lage, über die Komponente P eine hochaffine Bindung mit gelösten Biomolekülen in der Probe oder im Testreagenz einzugehen.

10 Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist eine Festphase mit einer Beschichtung, die ein oder mehrere Konjugate (Ia) oder/und (Ib) und vorzugsweise einen analytspezifischen Festphasenreaktanden enthält. Die erfindungsgemäßen Konjugate können zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine Festphase in einem Verfahren zum Nachweis eines  
15 Analyten eingesetzt werden, beispielsweise in einem immunologischen oder einem Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren. Ein weiterer Gegenstand des ersten Aspekts der vorliegenden Erfindung ist ein Reagenzienkit zum Nachweis eines Analyten, der neben anderen Testkomponenten ein erfindungsgemäßes Konjugat oder eine erfindungsgemäße Festphase  
20 enthält.

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform werden Biotin-Polyethylenglykolverbindungen verwendet, bei denen es sich um PEG-Ketten handelt, die an einem Kettenende mit einem Biotinrest funktionalisiert sind.  
25 Das andere Kettenende trägt vorzugsweise eine Hydroxyl- oder eine Methoxygruppe. Die Biotin-PEG-Konjugate werden auf eine Streptavidinfestphase nach oder gleichzeitig mit einem biotinylierten analytspezifischen Festphasenreaktanden, z.B. einem Antikörper, aufgebracht. Das Konjugat bindet auf den noch zugänglichen freien Biotinbindestellen der Streptavidinfestphase. Das nicht gebundene Biotin-PEG-Konjugat kann durch Waschen  
30 entfernt werden. Die resultierende Festphase kann in diesem Zustand getrocknet werden, ohne daß eine Beeinträchtigung der Funktion auftritt. Die

unspezifische Bindung einer mit einem erfindungsgemäßen Konjugat behandelten Oberfläche ist gegenüber einer unbehandelten Oberfläche oder gegenüber einer mit einer nicht-alkylenoxidmodifizierten Blockierungssubstanz behandelten Oberfläche stark vermindert. Ein weiterer Vorteil ist, daß

5 die erfindungsgemäße Festphase auch nach dem Aufbringen des Festphasenreaktanden mit dem Blockierungskonjugat behandelt und damit mit den gewünschten Eigenschaften versehen werden kann. Bei Festphasen, welche begrenzte Testflächen und eine durchgehende Vorbeschichtung aufweisen, wird sowohl innerhalb der Testflächen als auch außerhalb dieser

10 Testflächen (z.B. leere Streptavidinfestphase) eine deutliche Reduzierung der unspezifischen Bindung gefunden. Die Fähigkeit der Festphase zur Bindung des Analyten bleibt überraschenderweise unbeeinflußt.

Ein zweiter Aspekt der vorliegenden Erfindung ist ein Verfahren zum

15 Nachweis eines Analyten in einer Probe umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Festphase, auf der ein Festphasenreaktand immobilisiert ist, wobei man einen modifizierten Festphasenreaktanden verwendet, der mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelt ist,
- (b) Inkubieren der Probe mit der Festphase und einem Testreagenz und
- 20 (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten in der Probe.

Gemäß diesem zweiten Aspekt der Erfindung wird ein Polyalkylenoxid-modifizierter Festphasenreaktand auf der Festphase immobilisiert. Einerseits

25 kann der modifizierte Festphasenreaktand ein universeller Festphasenreaktand sein d.h. ein kovalent, adsorptiv oder über ein hochaffines Bindepär auf der Festphase immobilisierter Reaktand, der nicht spezifisch mit dem Analyten, sondern mit einem weiteren Festphasenreaktanden reagieren kann. Beispiele für universelle Festphasenreaktanden sind beispielsweise

30 Streptavidin oder Anti-Hapten-Antikörper, die mit einem biotinylierten oder Hapten-konjugierten analytspezifischen weiteren Festphasenreaktanden reagieren können. Andererseits oder zusätzlich kann auch der analytspezi-

T eine Endgruppe ausgewählt aus OH, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy ... und ist und  
m eine Zahl von 1 bis 10 ist,  
und worin die Konjugate vorzugsweise mindestens eine Bindungsstelle  
aufweisen, die nach Immobilisierung der Konjugate auf einer Festphase noch  
5 eine hochaffine Bindung mit einem löslichen Reaktanden eingehen kann.

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform werden Konjugate der  
allgemeinen Strukturformel (III) verwendet:



wobei

P' ein Partner eines hochaffinen Bindepaares ist,  
r' eine Zahl von 1 bis 10 ist,  
15 F ein Biomolekül ist,  
r eine Zahl von 1 bis 10 ist und  
AO, n, T und m wie für Konjugate der Strukturformel (II) definiert sind.

Konjugate der Strukturformeln (II) und (III) werden vorzugsweise als  
20 universelle oder analytspezifische Festphasenreaktanden in Nachweisver-  
fahren eingesetzt.

Der zweite Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft auch eine Festphase  
mit einer Beschichtung, die Konjugate der allgemeinen Strukturformel (II)  
25 oder/und (III) enthält. Die Konjugate können zur Verringerung der un-  
spezifischen Bindung an eine Festphase in einem Verfahren zur Bestimmung  
eines Analyten beispielsweise in einem immunologischen Verfahren oder  
einem Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren eingesetzt werden. Weiterhin  
betrifft der zweite Aspekt der Erfindung einen Reagenzienkit zum Nachweis  
30 eines Analyten, neben anderen Testkomponenten ein Konjugat der  
allgemeinen Strukturformel (II) oder (III) oder eine mit einem solchen  
Konjugat belegte Festphase enthält.

Ein dritter Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft ein Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe umfassend die Schritte:

- (a) Bereitstellen einer Festphase, auf der ein analytspezifischer Festphasenreaktand immobilisiert ist,
- 5 (b) Inkubieren der Probe mit der Festphase und einem Testreagenz, wobei das Testreagenz einen analytspezifischen modifizierten löslichen Reaktanden enthält, der mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelt ist, und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten  
10 in der Probe.

In diesem Aspekt der Erfindung wird ein modifizierter löslicher analyt-spezifischer Reaktand verwendet, d.h. ein mit einem zu bestimmenden Analyten oder/und Analytanalogon spezifisch bindefähiges Biomolekül. Der  
15 modifizierte lösliche Reaktand kann direkt markiert sein, d.h. eine Markierungsgruppe, z.B. eine Enzym-, Fluoreszenz- oder Elektrochemilumineszenzmarkierungsgruppe tragen. Andererseits kann der lösliche Reaktand auch indirekt markiert sein, d.h. er trägt eine mit einer nachweisbaren Markierungsgruppe reaktive Gruppe, z.B. ein Hapten, welches wiederum mit einem  
20 markierten Anti-Hapten-Antikörper reagieren kann.

Der modifizierte lösliche Reaktand wird vorzugsweise ausgewählt aus Antikörpern, Antigenen, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge und Lectinen.

25 Gemäß diesem dritten Aspekt der vorliegenden Erfindung werden vorzugsweise Konjugate der allgemeinen Strukturformel (IV) verwendet:



30 worin

M eine Markierungsgruppe oder eine mit einer Markierungsgruppe reaktive Gruppe ist,

s eine Zahl von 1 bis 10 ist,  
F" ein lösliches Biomolekül insbesondere ausgewählt aus Antikörpern, Antigenen, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloga und Lectinen ist und  
5 AO, n, T und m wie für Konjugate der Strukturformel (II) definiert sind.

Diese Konjugate können zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine Festphase in einem Verfahren zur Bestimmung eines Analyten, insbesondere in einem immunologischen Bestimmungsverfahren, einem Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren oder einem Zucker-Lectin-Bestimmungsverfahren eingesetzt werden. Weiterhin betrifft dieser dritte Aspekt der vorliegenden Erfindung einen Reagenzienkit zum Nachweis eines Analyten, der neben anderen Testkomponenten ein Konjugat der allgemeinen Formel  
15 (IV) enthält.

Gemäß einem vierten Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine Festphase beim Nachweis eines Analyten in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß man  
20 mindestens ein Reagenz verwendet, welches eine mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelte Substanz enthält.

Die mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelte Substanz wird vorzugsweise ausgewählt aus

25

- (i) Blockierungssubstanzen,
- (ii) universellen Festphasenreaktanden,
- (iii) analytspezifischen Festphasenreaktanden und
- (iv) löslichen Reaktanden

30

Vorzugsweise verwendet man bei dem Verfahren mehr als eine Alkylenoxid-modifizierte Klasse von Substanzen.

5

Weiterhin wird die Erfindung durch die nachfolgenden Beispiele erläutert.

## Beispiele

## 10



20

## 25



150 mg Aminomethoxy-PEG (Fa. Sigma) wurden in 100 ml Dioxan gelöst und anschließend mit 2 g Biotin-OSu-Ester, gelöst in 60 ml DMF, versetzt. Nach der Zugabe von 40 mg Triethylamin wurde 3 Stunden bei Raumtemperatur und weitere 3 Stunden bei 70°C gerührt. Die Lösungsmittel wurden  
5 anschließend abgezogen und das Produkt säulenchromatographisch gereinigt. Die Ausbeute betrug 57%.

### 3. Herstellung einer Biotin-PEG Festphase

10 Auf eine Streptavidin Festphase (p-Styrol beschichtet mit an thermisch polymerisiertes Rinderserumalbumin (RSA) gebundenem Streptavidin) wurden mittels Microdosiertechnik biotinylierte, gegen TSH gerichtete Antikörper in Form von Flächen mit einem Durchmesser von ca. 0,1 mm aufgebracht. Diese Festphase wurde nach dem Aufbringen der Antikörper-  
15 flächen mit Phosphatpuffer pH 7,5, der 50 µg/ml Bi-PEG enthält, nachbehandelt. Nach 2 minütiger Inkubation wurde nachgewaschen und getrocknet.

### 4. Untersuchung der unspezifischen Bindung an die Bi-PEG beschichtete Festphase

20

Die nach dem in Beispiel 3 beschriebenen Verfahren hergestellte Festphase wurde mit folgendem System bewertet: Nach Inkubation mit analytfreiem Probenmaterial (p24-freies Humanserum bzw. Enzymun®-TSH 0-Standard)  
25 und anschließendem Waschschrift wurden die mit Humanserum inkubierten Festphasen mit digoxigeniliertem Nachweisreagenz (p24-Dig-Konjugat, sowie mit Anti-Human IgG-Antikörper-Dig-Konjugat) inkubiert. Die digoxigenilierten Reagenzien sind nicht spezifisch gegenüber dem Anti-TSH-Antikörper, d.h. sie enthalten keinen Analyten, stellen aber Marker für die  
30 Höhe der unspezifischen Bindung dar. Nach einem Waschschrift wurde die unspezifische Bindung durch einen fluoreszenzgefärbten, mit Anti-Dig-Antikörpern markierten Latex bestimmt. Die mittels fluoreszenzmikroskopi-

scher Techniken erhaltenen Signale wurden mit optischer Bildauswertung quantifiziert und in Counts/sec. angegeben. Gemessen wurde die Fluoreszenzintensität innerhalb der Testflächen (mit biotinyliertem TSH-Antikörper) sowie außerhalb der Testflächen (Untergrund ohne Antikörperbeschichtung).

Tabelle 1: Ergebnisse in der Testfläche (mit TSH-Antikörpern) in Counts/sec

Festphase	Nachweisreagenz		
	TSH O-Standard	p24-Dig	<h-IgG>-Dig
ohne Bi-PEG	65	1897	1612
mit Bi-PEG	31	740	1231

Tabelle 2: Ergebnisse im Untergrund (Streptavidin-Festphase) in Counts/sec

Festphase	Nachweisreagenz		
	TSH O-Standard	p24-Dig	<h-IgG> Dig
ohne Bi-PEG	51	766	654
mit Bi-PEG	17	136	140

In allen Fällen führte der Zusatz von Bi-PEG zu einer deutlichen Verminderung an unspezifischer Bindung auf der Festphase.

## 5. Synthese eines Streptavidin-Polyethylenglykol-Konjugats

Streptavidin und PEG-OSu wurden in Phosphatpuffer gelöst und in der jeweils gewünschten Stöchiometrie, vorzugsweise 1:1 bis 1:5 zusammen-



gegeben. Nach 2 h Reaktion bei Raumtemperatur (?) wurde das Reaktionsgemisch gegen Phosphatpuffer mit 0,05% Natriumazid dialysiert und bei 4°C gelagert.

5      **6.      Herstellung einer universellen Streptavidin-PEG-Festphase**

Ein Reaktionsgefäß wurde mit einer Lösung, die biotinyliertes Trägerprotein, (RSA-Biotin oder Thermo RSA-Biotin) in einer Konzentration von 100 µg/ml enthält, befüllt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde die  
10      Lösung abgesaugt und das beschichtete Reaktionsgefäß mit Phosphatpuffer gespült und erneut abgesaugt.

Anschließend wurde Streptavidin-PEG in einer Konzentration von 50 µg/ml in Phosphatpuffer mit 1% RSA zugegeben und 15 min inkubiert. Danach  
15      wurde die Lösung abgesaugt und durch Zugabe von Phosphatpuffer mit 1% RSA und 2% Saccharose gewaschen. Nach erneutem Absaugen und Trocknen wurde die Festphase bei 4°C in luftdichter Verpackung gelagert.

20      **7.      Herstellung einer spezifischen Streptavidin-PEG-Festphase**

Ein Reaktionsgefäß wurde mit einer Lösung, die biotinyliertes Trägerprotein in einer Konzentration von 100 µg/ml enthält, befüllt und 5 min inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt, mit Phosphatpuffer gespült und erneut abgesaugt. Dann wurde Streptavidin-PEG (50 µg/ml) in Phosphatpuffer mit  
25      1% RSA zugegeben und 15 min inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt, mit Phosphatpuffer gespült und erneut abgesaugt.

Dann wurde ein biotinylierter Antikörper, z.B. ein monoklonales Anti-TSH-Antikörper-Fab'-Fragment (5 µg/ml) zugegeben und 15 min inkubiert. Die  
30      Lösung wurde abgesaugt, durch Zugabe von Phosphatpuffer mit 1% RSA, 2% Saccharose gespült und erneut abgesaugt. Nach Trocknen wurde die Festphase bei 4°C in luftdichter Verpackung gelagert.

### 8.1 Bewertung von Streptavidin-PEG Festphasen

Ein Reaktionsgefäß mit der Festphase aus Beispiel 6 oder 7 wurde mit einer vorverdünnten analytfreien Probe (Pferdeserum 1:1 verdünnt mit Beladepuffer 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,5% RSA, 0,05% Tween 20, 0,9% NaCl) 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Waschen wurde 20 min in Gegenwart von Signalantikörper (1 µg/ml monoklonaler Anti-TSH-Antikörper IgG-Digoxigenin-Konjugat in Beladepuffer) inkubiert und erneut gewaschen.

Nach Zugabe von Nachweisreagenz (0,01% Lösung von Fluoro-Beads mit monoklonalem Anti-Digoxigenin-Antikörper-IgG beschichtet) wurde 20 min inkubiert, gewaschen und das Fluoreszenzsignal gemessen.

Tabelle 3: Fluoreszenzleerwerte (arb. units) auf unterschiedlichen Festphasen

	unspezifische Festphase	spezifische Festphase
SA underivatisiert	199	373
SA-PEG (1:1)	114	114
SA-PEG (1:5)	(100)	(100)

### 8.2 Unspezifische Bindung von Pufferbestandteilen

Ein Reaktionsgefäß mit der Festphase aus Beispiel 6 oder 7 wurde wie im Beispiel 8.2 beschrieben mit einer Pferdeserumprobe befüllt und gewaschen. Dann wurden 0,2 µg/ml p24-Digoxigenin in Beladepuffer zugegeben, 20 min inkubiert und gewaschen. Dann wurde Nachweisreagenz (vgl. 8.1) zugegeben, erneut 20 min inkubiert, gewaschen und das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4: unspezifische Bindung von p24-Digoxigenin (arb. units) auf unterschiedlichen Festphasen

	unspezifische Festphase	spezifische Festphase
SA underivatisiert	691	(> 1500)
SA-PEG (1:1)	260	660
SA-PEG (1:5)	124	365

### 8.3 Unspezifische Bindung von humanen IgG-Antikörpern

Ein Reaktionsgefäß mit den in Beispiel 6 und 7 hergestellten Festphasen wurde wie in 8.1 beschrieben, mit einer Probe befüllt und gewaschen. Die Probe war Humanserum, 1:19 mit Beladepuffer verdünnt.

Dann wurden 1,0 µg/ml monoklonaler Anti-human-IgG-Antikörper-Digoxigenin-Konjugat in Beladepuffer zugegeben und gewaschen. Anschließend wurde das Nachweisreagenz zugegeben, 20 min inkubiert, erneut gewaschen und das Fluoreszenzsignal gemessen. Die Ergebnisse sind in der nachfolgenden Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 5: unspezifische Bindung von Humanantikörpern (arb. units) auf unterschiedlichen Festphasen

	unspezifische Festphase	spezifische Festphase
SA underivatisiert	2549	(> 3000)
SA-PEG (1:1)	944	1749
SA-PEG (1:5)	515	834

## 9. Herstellung von Antikörper-PEG-Konjugaten

Die Herstellung von PEG-Antikörper-Konjugaten erfolgte wie in Beispiel 5 beschrieben, außer daß an Stelle von Streptavidin ein biotinylierter Antikörper verwendet wurde.

## 10. Herstellung von mit PEG-Antikörper-Konjugaten beschichteten Festphasen

Ein Reaktionsgefäß wurde mit einer Lösung, die mit 100  $\mu\text{g/ml}$  biotinyliertes Trägerprotein (RSA-Biotin oder tRSA-Biotin) enthält, 5 min inkubiert. Dann wurde die Lösung abgesaugt, mit Phosphatpuffer gespült und erneut abgesaugt.

Anschließend wurden 50  $\mu\text{g/ml}$  Streptavidin in Phosphatpuffer mit 1 % RSA zugegeben und 15 min inkubiert. Diese Lösung wurde abgesaugt, mit Phosphatpuffer gespült und erneut abgesaugt. Anschließend wurden 5  $\mu\text{g/ml}$  biotinylierter IgG-Antikörper, z.B. ein monoklonales Anti-TSH-Fab'<sub>2</sub>-Antikörperfragment, zugegeben und 15 min inkubiert. Die Lösung wurde abgesaugt und ein Spülschritt mit Phosphatpuffer, 1 % RSA, 2 % Saccharose durchgeführt. Nach erneutem Absaugen wurde das Reaktionsgefäß getrocknet und bei 4°C in luftdichter Verpackung gelagert.

## 11. Bewertung

25

### 11.1 Leerwert

Die Bestimmung eines Leerwerts der in Beispiel 10 hergestellten Festphase erfolgte wie in Beispiel 8.1 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 6 dargestellt.

30

Tabelle 6: Fluoreszenzleerwerte (arb. units) auf unterschiedlichen Festphasen

	Signale (arb. units)
AK underivatisiert	270
AK-PEG (1:1)	94
AK-PEG (1:5)	57

### 11.2 Unspezifische Bindung von Pufferbestandteilen

Die unspezifische Bindung von Pufferbestandteilen an die in Beispiel 10 hergestellte Festphase wurde wie unter Beispiel 8.2 beschrieben bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: unspezifische Bindung von p24-Digoxigenin (arb. units) auf unterschiedlichen Festphasen

	spezifische Festphase
AK underivatisiert	26658
AK-PEG (1:1)	23519
AK-PEG (1:5)	7998

### 11.3 Bestimmung der unspezifischen Bindung von Human-Antikörpern (IgG)

Die Bestimmung der unspezifischen Bindung von humanen IgG-Antikörpern an die in Beispiel 10 hergestellte Festphase erfolgte wie unter Beispiel 8.3 beschrieben. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: unspezifische Bindung von Humanantikörpern (arb. units) auf unterschiedlichen Festphasen

	spezifische Festphase
AK underivatisiert	11379
AK-PEG (1:1)	10475
AK-PEG (1:5)	4446

**Beispiel 12 Durchführung eines <HIV I> Tests und Testergebnisse mit Negativproben**

Auf einen Polystyrolträger wurde auf eine Testfläche von ca. 100  $\mu\text{m}$  Durchmesser ein Antigen aufgebracht, welches das gp41 des HIV-I-Virus repräsentiert. Auf die Testfläche wurden 30  $\mu\text{l}$  mit Probenpuffer vorverdünnte Probe pipettiert und 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und Waschen des Testfeldes mit Waschpuffer wurden 30  $\mu\text{l}$  Reagenzlösung mit einem Dig-markierten gp41-repräsentierenden HIV I-Antigen pipettiert und wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Reagenzlösung und Waschen des Testfeldes mit Waschpuffer werden 30  $\mu\text{l}$  Nachweisreagenz auf das Testfeld pipettiert. Als Nachweisreagenz dienen 100 nm große, fluoreszenzgefärbte Latexpartikel, die kovalent mit einem Anti-Dig-Antikörper beschichtet sind.

Dieses Nachweisreagenz wurde wiederum 20 Minuten unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert, anschließend abgesaugt, gewaschen und trockengesaugt. Das Testfeld wurde mit einem He-Ne-Laser mit 633 nm Wellenlänge bestrahlt und die Fluoreszenz bei 670 nm Wellenlänge mit einer CCD-Kamera vermessen.

Folgende testspezifischen Reagenzien wurden verwendet:

Festphasenantigen: Polyhaptan aus gp41-Peptid

Nachweisantigen: Polyhaptan aus pg41-Peptid, Dig-markiert.

Folgende Meßwerte (Counts) wurden gemessen:

Probe	Untergrund* [Counts]	Signal Testfeld [Counts]	Signal Test- feld - Untergrund	Cut-off- Index**
Negativkon- trolle	148	148	0	0,0
Positiv Probe 1	178	26435	26257	88,1
Positivprobe 2	172	22908	22376	76,8
Negativprobe 1	101	101	0	0,0
Negativprobe 2	103	103	0	0,0
Negativprobe 3	93	93	0	0,0
Negativprobe 4	98	98	0	0,0
Negativprobe 5 (S441)	86	4401	4315	14,6
Negativprobe 6 (S480)	137	2690	2553	8,6
Negativprobe 7 (S486)	107	3833	3726	12,6
Negativprobe 8 (S520)	116	4331	4215	14,2

\* Untergrund entspricht Signal neben den Testfeldern

\*\*  $\text{Cut-off-Index} = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Signal}_{\text{Untergrund}}}{2 \times \text{Signal}_{\text{Negativkontrolle}}}$

Cut-off-Index < 1 = negativ

Die obige Tabelle spiegelt einen Ausschnitt aus einer Spezifitätsstudie wieder. In dieser Studie wurden ca. 240 <HIV I> negative Proben ver-

messen. Der Großteil der Proben (z.B. Negativproben 1-4) zeigte keine Reaktion auf den Testfeldern und war somit eindeutig negativ. Allerdings wurden 4 Proben (Negativproben 5-8) gefunden, die eine starke unspezifische Reaktion auf den Testfeldern zeigten und somit als falsch positiv detektiert wurden.

### Beispiel 13 Verbesserung der Spezifität durch PEG-derivatisiertes Festphasenantigen

In diesem Versuch wurde ein <HIV I> Test analog Beispiel 12 durchgeführt. Im Unterschied dazu wurden auf dem identischen Testträger neben dem HIV I-Antigen zusätzlich ein identisches Antigen aufgebracht, welches im Stöchiometrieverhältnis von 1:1 mit PEG 500 derivatisiert wurde.

Folgende Meßwerte wurden erhalten:

Probe	Untergrund* [Counts]	Polyhaptent-gp41-Peptid		Polyhaptent-gp41-Peptid-PEG	
		Counts**	COI***	Counts**	COI***
Negativ-Kontr.	52	0	0.0	31	0.3
Positiv-Kontr.	63	286	2.0	8383	80
Positivprobe 1	212	11752	111	6227	57.8
Positivprobe 2	84	1632	14.9	3762	35.3
S441	50	1061	9.7	79	0.3
S480	53	871	7.9	102	0.5
S486	44	1041	9.6	98	0.5
S520	44	1260	11.7	84	0.4

\* Untergrund entspricht Signal neben den Testfeldern



\*\*  $\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Signal}_{\text{Untergrund}}$

\*\*\*  $\text{COI} = \text{Cut-off-Index} = \frac{\text{Signal}_{\text{Probe}} - \text{Signal}_{\text{Untergrund}}}{2} \times \text{Signal}_{\text{Negativkontrolle}}$

Cut-off-Index < 1 = negativ

- 5 Dieses Ergebnis zeigt, daß die unspezifische Bindung der Störproben in den  
<HIV I>-Testfläche durch Verwendung des neuen PEG-derivatisierten  
Antigens drastisch reduziert wird, so daß alle 4 Störproben negativ werden.  
Überraschenderweise kann die PEG-Derivatisierung sogar zu einer starken  
Erhöhung des Signals von Positivproben führen (siehe Positivkontrolle und  
10 Positivprobe 1).

#### 14. Nachweis von HBs-Antigen

Auf einen Polystyrolträger wurde auf eine Testfläche von ca. 100 µm Durch-  
15 messer ein monoklonaler Antikörper gegen HBs-Antigen aufgebracht. Auf  
eine weitere Testfläche wurde derselbe Antikörper in Form eines PEG-  
Konjugats (Herstellung Beispiel 9) aufgebracht. Auf die Testfläche wurden  
dann 30 µl mit Probenpuffer vorverdünnte Probe pipettiert und 20 min unter  
Schütteln in Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der Probe und  
20 Waschen der Testfläche mit Waschpuffer werden 30 µl Reagenzlösung mit  
Digoxigenin-markiertem Anti-HBsAg-Antikörper zupipettiert und wiederum  
20 min unter Schütteln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Absaugen der  
Lösung und Waschen der Testfläche mit Waschpuffer wurden 30 µl  
Nachweisreagenz (Beispiel 8.3) auf die Testfläche pipettiert.

25

Der Nachweis erfolgte wie in Beispiel 8.1 beschrieben.

Untersucht wurden ein positiver Standard, ein negativer Standard sowie  
fünf Negativseren, die kein HBsAg enthalten, aber im Test dennoch  
30 signifikant positive Signale liefern, die auf analytunspezifische Wechselwir-  
kungen mit der Festphase zurückzuführen waren. In der Tabelle 9 sind die  
Ergebnisse dieser Versuche aufgelistet. Es ist klar zu erkennen, daß die

unspezifischen Bindungen mit PEG-derivatisierten Antikörper sehr viel niedriger ausfallen, als bei unbehandelten Antikörpern.

Tabelle 9

5

	Meßsignal	
Probe	MAK < HBs >	MAK < HBs > PEG
Pos. Standard	1080	960
Neg. Standard	1,3	1,7
Negativserum 1	16	3,4
Negativserum 2	28	12
Negativserum 3	15	1,3
Negativserum 4	11,5	2
Negativserum 5	18	9

10

15

### Ansprüche

1. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe, umfassend  
5 die Schritte:
  - (a) Bereitstellen einer Festphase umfassend in immobilisierter Form einen analytspezifischen Festphasenreaktanden und ein analytunspezifisches Biomolekül, das mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelt ist,
  - 10 (b) Inkubieren der Probe mit der Festphase und einem Testreagenz und
  - (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten in der Probe.
- 15 2. Verfahren nach Anspruch 1,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine Festphase verwendet, die mindestens eine begrenzte Testfläche aufweist.
- 20 3. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man eine Festphase verwendet, die mit einem ersten Partner eines hochaffinen Bindepaares belegt ist, an die ein Konjugat des analytspezifischen Festphasenreaktanden mit dem zweiten Partner  
25 des Bindepaares immobilisiert wird.
4. Verfahren nach Anspruch 3,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß das hochaffine Bindepaar ausgewählt wird aus Streptavidin oder  
30 Avidin/Biotin oder ein Biotinderivat, Antikörper/Hapten, Antikörper/-Antigen, Lectin/Zucker und Rezeptor/Ligand.

5. Verfahren nach Anspruch 4,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man als hochaffines Bindepaar Streptavidin oder Avidin/Biotin  
verwendet.

5

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine Blockierungssubstanz verwendet, die den zweiten  
Partner des Bindepaares umfaßt.

10

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 3 bis 5,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man eine Blockierungssubstanz verwendet, bei der ein oder  
mehrere Polyalkylenoxidreste direkt an den zweiten Partner des  
Bindepaares gekoppelt sind.

15

8. Konjugate der allgemeinen Strukturformel (Ia) oder (Ib):



20



worin

P ein Partner eines hochaffinen Bindepaares ist,

I ein inerter Träger ist,

25

r eine Zahl von 1 bis 10 ist,

AO eine (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxidgruppe ist,

n eine Zahl von 5 bis 500 ist,

T eine Endgruppe ausgewählt aus OH, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy und ... ist  
und

30

m eine Zahl von 1 bis 10 ist.

9. Konjugate nach Anspruch 8,  
worin P Biotin oder ein Biotinderivat ist
- 5 10. Festphase mit einer Beschichtung, die ein Konjugat nach Anspruch  
8 oder 9 enthält.
11. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 8 oder 9 zur Ver-  
ringerung der unspezifischen Bindung an eine Festphase in einem  
Verfahren zum Nachweis eines Analyten.
- 10 12. Verwendung nach Anspruch 11 in einem Verfahren ausgewählt aus  
immunologischen Bestimmungsverfahren und Nukleinsäure-Hybridi-  
sierungsverfahren.
- 15 13. Reagenzienkit zum Nachweis eines Analyten, der neben anderen  
Testkomponenten ein Konjugat nach Anspruch 8 oder 9 oder eine  
Festphase nach Anspruch 10 enthält.
- 20 14. Verfahren zum Nachweis eines Analyten in einer Probe umfassend  
die Schritte:
- (a) Bereitstellen einer Festphase, auf der ein Festphasenreaktand  
immobilisiert ist, wobei man einen modifizierten Festphasenre-  
aktanden verwendet, der mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid  
gekoppelt ist,
- 25 (b) Inkubieren der Probe mit der Festphase und einem Testreagenz  
und
- (c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des  
Analyten in der Probe.

15. Verfahren nach Anspruch 14,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man einen modifizierten universellen Festphasenreaktanden auf  
der modifizierten Festphase immobilisiert.
- 5
16. Verfahren nach einem der Ansprüche 14 oder 15,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man einen modifizierten analytspezifischen Festphasenreaktan-  
den auf der Festphase immobilisiert.
- 10
17. Verfahren nach Anspruch 15,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man einen universellen modifizierten Festphasenreaktanden ver-  
wendet, der ein Partner eines hochaffinen Bindepaares oder ein  
Konjugat eines analytunspezifischen Biomoleküls mit einem Partner  
eines hochaffinen Bindepaares ist.
- 15
18. Verfahren nach Anspruch 17,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man einen universellen modifizierten Festphasenreaktanden  
ausgewählt aus Streptavidin, Avidin, Hapten-spezifischen Antikörp-  
ern, Lectinen und polymeren Konjugaten davon verwendet
- 20
19. Verfahren nach Anspruch 17,  
**dadurch gekennzeichnet,**  
daß man einen universellen modifizierten Festphasenreaktanden  
ausgewählt aus Konjugaten von inerten Polypeptiden oder Polysa-  
cchariden gekoppelt mit Biotin, Biotinderivaten, Haptenen oder  
Zuckern verwendet.
- 25
- 30

20. Verfahren nach Anspruch 16,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen analytspezifischen modifizierten Festphasenreaktan-  
den verwendet, der ein Konjugat mit einem Partner eines hochaffinen  
Bindepaares ist.

21. Verfahren nach Anspruch 20,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen analytspezifischen modifizierten Festphasenreaktan-  
den ausgewählt aus analytspezifischen Antikörpern, Antigenen, Nu-  
kleinsäuren, Nukleinsäureanaloga und Lectinen verwendet.

22. Konjugate der allgemeinen Strukturformel (II):



worin

- F ein Biomolekül ist, das ein Partner eines hochhaffinen Binde-  
paares ist, ausgewählt aus Lectinen, Streptavidin, Avidin und  
Anti-Hapten-Antikörpern ist,  
r eine Zahl von 1 bis 10 ist,  
AO eine C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>-Alkylenoxidgruppe ist,  
n eine Zahl von 5 bis 500 ist,  
T eine Endgruppe ausgewählt aus OH, C<sub>1</sub>-C<sub>4</sub>-Alkoxy ... ist und  
m eine Zahl von 1 bis 10 ist.

23. Konjugate der allgemeinen Strukturformel (III):



wobei

- P' ein Partner eines hochaffinen Bindepaares ist,

r' eine Zahl von 1 bis 10 ist,  
F ein Biomolekül ist,  
r eine Zahl von 1 bis 10 ist und  
AO, n, T und m wie in Anspruch 22 definiert sind.

5

24. Festphase mit einer Beschichtung, die ein Konjugat nach Anspruch 22 oder 23 enthält.

10

25. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 22 oder 23 zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine Festphase in einem Verfahren zur Bestimmung eines Analyten.

15

26. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 25 in einem Verfahren ausgewählt aus immunologischen Bestimmungsverfahren und Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren.

20

27. Reagenzienkit zum Nachweis eines Analyten, der neben anderen Testkomponenten ein Konjugat nach Anspruch 22 oder 23 oder eine Festphase nach Anspruch 24 enthält.

25

28. Verfahren zum Nachweis eines Analyten umfassend die Schritte:  
(a) Bereitstellen einer Festphase, auf der ein analytspezifischer Rezeptor immobilisiert ist,  
(b) Inkubieren der Probe mit der Festphase und einem Testreagenz, wobei das Testreagenz einen analytspezifischen modifizierten löslichen Reaktanden enthält, der mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelt ist, und  
(c) Nachweisen des Vorhandenseins oder/und der Menge des Analyten in der Probe.

30



29. Verfahren nach Anspruch 28,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen modifizierten löslichen Reaktanden verwendet, der  
eine Markierungsgruppe trägt oder mit einer Markierungsgruppe  
reagieren kann.

30. Verfahren nach Anspruch 29,  
dadurch gekennzeichnet,  
daß man einen modifizierten Reaktanden ausgewählt aus Antikörpern,  
Antigenen, Nukleinsäuren, Nukleinsäureanaloge und Lectinen  
verwendet.

31. Konjugate der allgemeinen Formel (IV):



worin

m eine Markierungsgruppe oder eine mit einer Markierungsgruppe  
reaktive Gruppe ist,

s eine Zahl von 1 bis 10 ist,

F'' ein lösliches Biomolekül ist, das spezifisch mit einem zu  
bestimmenden Analyten reagieren kann und

AO, n, T und m wie in Anspruch 22 definiert sind.

32. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 31 zur Verringerung der  
unspezifischen Bindung an eine Festphase in einem Verfahren zur  
Bestimmung eines Analyten.

33. Verwendung eines Konjugats nach Anspruch 32 in einem Verfahren  
ausgewählt aus immunologischen Bestimmungsverfahren und  
Nukleinsäure-Hybridisierungsverfahren.

34. Reagenzienkit zum Nachweis eines Analyten, der neben anderen Testkomponenten ein Konjugat nach Anspruch 32 enthält.
- 5 35. Verfahren zur Verringerung der unspezifischen Bindung an eine Festphase beim Nachweis eines Analyten in einer Probe, **dadurch gekennzeichnet,** daß man mindestens ein Reagenz verwendet, welches eine mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelte Substanz enthält.
- 10 36. Verfahren nach Anspruch 35, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Substanz ausgewählt wird aus
- (i) Blockierungssubstanzen,
  - (ii) analytunspezifischen Festphasenreaktanden,
  - 15 (iii) analytspezifischen Festphasenreaktanden und
  - (iv) löslichen Reaktanden.
37. Reagenzienkit zum Nachweis eines Analyten, umfassend mindestens ein Reagenz, welches eine mit einem Poly (C<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>)-Alkylenoxid gekoppelte Substanz enthält.
- 20 38. Reagenzienkit nach Anspruch 37, **dadurch gekennzeichnet,** daß die Substanz ausgewählt ist aus
- 25 (i) Blockierungssubstanzen,
  - (ii) analytunspezifischen Festphasenreaktanden
  - (iii) analytspezifischen Festphasenreaktanden und
  - (iv) löslichen Reaktanden.

### **Zusammenfassung**

Es wird die Verwendung von Polyalkylenoxid-modifizierten Reagenzien in  
5 Verfahren zum Nachweis eines Analyten oder in für solche Verfahren  
geeigneten Reagenzienkits offenbart.

vo 24.07.97 12:54

10



Creation date: 08-02-2005  
Indexing Officer: NDINH3 - NGUYET DINH  
Team: OIPEBackFileIndexing  
Dossier: 09184043

Legal Date: 11-23-1998

No.	Doccode	Number of pages
1	PEFN	1

Total number of pages: 1

Remarks:

Order of re-scan issued on .....